

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

19.3.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

2003年 3月19日

出願番号  
Application Number:

特願2003-076254

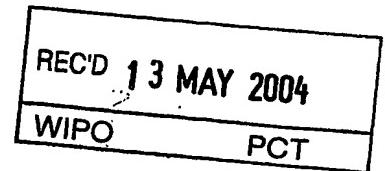
[ST. 10/C] :

[JP2003-076254]

出願人

Applicant(s):

純正化学株式会社

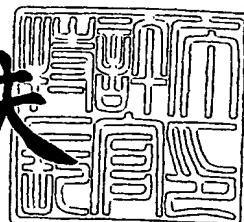


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3034309

【書類名】 特許願  
【整理番号】 TAK02001P  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/00  
【発明者】  
【住所又は居所】 千葉県船橋市習志野台1丁目6番8号  
【氏名】 高久 洋  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都江東区大島1丁目2番1号 202  
【氏名】 黒崎 直子  
【特許出願人】  
【識別番号】 591028577  
【氏名又は名称】 純正化学株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100090251  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 森田 憲一  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 017813  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【フルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規アンチセンスオリゴヌクレオチド及び抗HIV剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1で表される塩基配列の第6番目～第44番目の塩基からなる配列における、連続する少なくとも15塩基からなる配列に相補的な塩基配列からなる、オリゴヌクレオチド。

【請求項2】 配列番号1で表される塩基配列の第6番目～第44番目の塩基からなる配列における、連続する少なくとも15塩基からなる配列に特異的にハイブリダイズ可能な塩基配列を含む、オリゴヌクレオチド。

【請求項3】 オリゴヌクレオチドの少なくとも1つのインターヌクレオチド結合が、ホスホロチオエート型結合である、請求項1又は2に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドを有効成分として含む、抗HIV剤。

【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規アンチセンスオリゴヌクレオチド及び抗HIV剤（HIV治療及び／又は予防剤）に関する。

#### 【0002】

【従来の技術】

ヒト免疫不全ウイルス（以下、HIVと略称する）に対する抗ウイルス剤として、遺伝子を標的とするアンチセンス法に基づくアプローチが知られている。アンチセンス法とは、標的遺伝子に対して相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて、標的遺伝子の転写、スプライシング、及び／又はタンパク質への翻訳を阻害して、ウイルスタンパク質の発現を特異的に抑制する技術である。こうしたアンチセンス法の開発で最も重要な課題の1つは、標的部位の選択である。

#### 【0003】

抗HIV剤の有効成分として有用なアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、例えば、CXCR4遺伝子又はCCR5遺伝子の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチド【特開平11-292795号公報（特許文献1）】、あるいは、env部分、env及びpol部分、又はenv、pol、及びgag部分の各部分に対するアンチセンスRNA【特表2001-502884号公報（特許文献2）】などが公知である。

#### 【0004】

##### 【特許文献1】

特開平11-292795号公報

##### 【特許文献2】

特表2001-502884号公報

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、より効果的なHIVの感染治療及び／又は感染予防を可能とする、抗HIV剤の有効成分として有用な新規オリゴヌクレオチド、及びそれを含有する抗HIV剤（HIV治療及び／又は予防剤）を提供することにある。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

前記課題は、本発明による、配列番号1で表される塩基配列の第6番目～第44番目の塩基からなる配列における、連続する少なくとも15塩基からなる配列に相補的な塩基配列からなる、オリゴヌクレオチドによって解決することができる。

また、本発明は、配列番号1で表される塩基配列の第6番目～第44番目の塩基からなる配列における、連続する少なくとも15塩基からなる配列に特異的にハイブリダイズ可能な塩基配列を含む、オリゴヌクレオチドに関する。

更に、本発明は、前記オリゴヌクレオチドを有効成分として含む、抗HIV剤に関する。

#### 【0007】

本明細書において、「HIV」とは、ヒト免疫不全ウイルス(human immunodeficiency virus)を指す。

iency virus) を意味し、HIV-1及びその変異体を含む。

### 【0008】

#### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

##### [1] 本発明のオリゴヌクレオチド

本発明のオリゴヌクレオチドには、

(1) 配列番号1で表される塩基配列の第6番目～第44番目の塩基からなる配列における、連続する少なくとも15塩基からなる配列に相補的な塩基配列からなる、オリゴヌクレオチド、及び

(2) 配列番号1で表される塩基配列の第6番目～第44番目の塩基からなる配列における、連続する少なくとも15塩基からなる配列に特異的にハイブリダイズ可能な塩基配列を含む、オリゴヌクレオチド  
が含まれる。

### 【0009】

配列番号1で表される塩基配列は、HIV-1のDLS (Dimer Linkage Structure) 領域に存在するDIS (Dimerization Initiation Site) 領域及びその近傍の塩基配列であり、配列番号1で表される塩基配列の第9番目～第43番目がDIS領域である（図6及び図7参照）。

### 【0010】

図6及び図7に示すように、HIV-1のDLSは、5'LTRの下流からgag開始コドン領域に位置している。この何のタンパク質も翻訳しないフランкиング (flanking) 配列が、1995年当初、HIV-1の複製過程において重要であるという報告がされた (Muriaux, D.ら, J. Biol. Chem., 270, 8209-16, 1995)。また、同時期にイン・ビトロでの研究でDLS領域に存在するDISがHIV-1の複製に欠かすことのできない部位であると報告された (Berkhout, B. 及びvan Wamel, J. L., RNA, 6, 282-95, 2000; Damgaard, C. K.ら, Nucleic Acids Res., 26, 3667-76, 1998)。DISは、gagの開始コドン及びSD (Splicing Donor Site) の上流に位置しており、ステムループ構造を形成していると考えられている。

しかし、DIS領域を標的とするアンチセンス法については、これまで全く報告

がなく、有効であるか否かについても全く報告がなかった。アンチセンス法においては、標的配列がウイルスの複製又は増殖に必須であったとしても、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドが必ずしも抗ウイルス剤として有効でないことは周知の事実であり、HIVの產生に重要であると考えられていたDIS領域についてもその有効性は当業者といえども予想することができないことであった。

### 【0011】

本発明者は、後述の実施例に具体的に示すように、前記DIS領域及びその近傍の塩基配列（配列番号1で表される塩基配列）に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドとして、5種類のホスホロチオエート型オリゴデオキシヌクレオチド（S-ODN；Anti-692, Anti-694, Anti-703, Anti-713, 及びAnti-715）を設計し、そのHIV-1產生阻害効果を検討したところ、5種類の中の3種類のアンチセンスオリゴヌクレオチド（Anti-694, Anti-703, 及びAnti-713）のみが、投与量依存的に、優れたHIV-1產生阻害作用を示すを見出した。

この際、HIVの產生に重要であると考えられる他の標的領域として、gag領域を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド（28AS）、及びウイルス遺伝子の逆転写に重要なポリプリントラック領域を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド（PPT-AS）についても、HIV-1產生阻害効果を検討したが、これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドには効果がなかった。

このように、HIVの產生に重要であると考えられる複数の標的領域の内、DIS領域のみが標的として有効であったことは、実験前には全く予想することのできない、予想外の結果であった。更に、DIS領域がHIVの產生に重要であることについては、種々の報告があったが、DIS領域を標的配列として含むアンチセンスオリゴヌクレオチド（Anti-692及びAnti-715）であってもHIV-1產生を阻害することができないことは、DIS領域の重要性を考慮すると、予想外の結果であった。

### 【0012】

配列番号1で表される塩基配列の第6番目～第44番目の塩基からなる配列における、連続する少なくとも15塩基からなる配列に相補的な塩基配列からなる、本発明のオリゴヌクレオチドは、少なくとも15塩基からなる限り、その塩基数は特に限定されるものではない。標的領域への特異的なハイブリダイズを保証

するためには、塩基数は、好ましくは15塩基以上であり、より好ましくは18塩基以上であり、更に好ましくは20塩基以上である。また、膜透過性を保証するためには、好ましくは30塩基以下であり、より好ましくは28塩基以下であり、更に好ましくは25塩基以下である。本発明の前記オリゴヌクレオチドは、15～30塩基であることが好ましく、18～28塩基であることがより好ましく、20～25塩基であることが更に好ましく、20塩基であることが特に好ましい。

#### 【0013】

配列番号1で表される塩基配列の第6番目～第44番目の塩基からなる配列における、連続する少なくとも15塩基からなる配列に特異的にハイブリダイズ可能な塩基配列を含む、本発明のオリゴヌクレオチドは、生体内と同じ条件下（例えば、37℃の液体培地中）で前記塩基配列にハイブリダイズすることができ、しかも、抗HIV活性を示すオリゴヌクレオチドである限り、特に限定されるものではないが、例えば、

配列番号1で表される塩基配列の第6番目～第44番目の塩基からなる配列における、連続する少なくとも15塩基からなる配列に相補的な塩基配列を含み、しかも、抗HIV活性を示すオリゴヌクレオチド、あるいは、

配列番号1で表される塩基配列の第6番目～第44番目の塩基からなる配列における連続する少なくとも15塩基からなる配列において、1又は数個（好ましくは1又は2個、より好ましくは1個）の塩基が置換、挿入、及び／又は欠失した塩基配列に相補的な塩基配列を含み、しかも、抗HIV活性を示すオリゴヌクレオチド

を挙げることができる。

#### 【0014】

配列番号1で表される塩基配列の第6番目～第44番目の塩基からなる配列における、連続する少なくとも15塩基からなる配列に相補的な塩基配列を含み、しかも、抗HIV活性を示すオリゴヌクレオチドとしては、例えば、

配列番号1で表される塩基配列の第6番目～第44番目の塩基からなる配列における、連続する少なくとも15塩基からなる配列に相補的な塩基配列の5'末端

及び／又は3'末端において、1又は数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個、更に好ましくは1又は2個、特に好ましくは1個）の塩基が付加された塩基配列からなり、しかも、抗HIV活性を示すオリゴヌクレオチド

を挙げることができる。

より具体的には、

配列番号3～5のいずれかの塩基配列（但し、各ヌクレオシド間のインターヌクレオチド結合は、それぞれ独立に、リン酸ジエステル結合又は修飾リン酸ジエスル結合であるものとする）からなるオリゴヌクレオチド、あるいは、前記塩基配列の5'末端及び／又は3'末端において、1又は数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個、更に好ましくは1又は2個、特に好ましくは1個）の塩基が付加された塩基配列からなり、しかも、抗HIV活性を示すオリゴヌクレオチド

を挙げることができる。

なお、5'末端及び／又は3'末端に付加する塩基は、配列番号1で表される塩基配列の相当する塩基に対する相補的塩基であることが好ましい。

### 【0015】

本発明のオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドとして作用することができる限り、例えば、デオキシヌクレオシド、リボヌクレオシド、及び／又はそれらの修飾ヌクレオシド（例えば、2'-0-修飾リボヌクレオシド）から形成することができる。修飾リボヌクレオシドとしては、標的となる塩基配列との結合力の強さの点から、2'-0-メチルリボヌクレオシドが好ましい。

従って、本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば、リボヌクレオシド及び／又は修飾リボヌクレオシドからなるオリゴリボヌクレオチド（RNA）、デオキシリボヌクレオシドのみからなるオリゴデオキシリボヌクレオチド（DNA）、あるいはリボヌクレオシド（及び／又は修飾リボヌクレオシド）とデオキシリボヌクレオシドとの両方からなるキメラオリゴリボ／デオキシリボヌクレオチド（RNA/DNA）であることができる。

### 【0016】

本発明のオリゴヌクレオチドにおいて、各ヌクレオシド間のインターナスクレオチド結合は、それぞれ独立に、リン酸ジエステル結合又は修飾リン酸ジエステル結合である。修飾リン酸ジエステル結合としては、例えば、リン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子2個の内の酸素原子1個をメチル基に置換したメチルホスホネート結合、リン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子2個の内の酸素原子1個をアミノ基若くは置換アミノ基に置換したホスホロアミダイト結合、又はリン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子2個の内の酸素原子1個を硫黄原子に置換したホスホロチオエート型結合などを挙げることができ、それらの1種又はそれ以上を、ヌクレオシド間の結合の1箇所又はそれ以上の箇所に導入することができる。

#### 【0017】

本発明のオリゴヌクレオチドとしては、配列特異的結合性、簡便な調製法、及び合成コストなどの点からは、リン酸ジエステル結合体であることが好ましく、二重鎖安定性、抗ヌクレアーゼ耐性、細胞膜透過性、及び低細胞毒性と適度な代謝性などの点からは、修飾されたリン酸ジエステル結合体であることが好ましい。生体内での安定性が良いことから、ホスホロチオエート型結合であることが特に好ましい。

#### 【0018】

本発明において用いるオリゴヌクレオチドは、公知の方法で合成することができる。2'-0-メチルリボヌクレオチド又はホスホロチオエート結合を導入する部位を除いては、例えば、通常のホスホジエステル法又はホスホトリエステル法、例えば、H-ホスホネート法、又はホスホロアミダイト法によるDNA/RNA自動合成機を利用して合成することができる。

#### 【0019】

ホスホロチオエート結合を有するオリゴヌクレオチドは、例えば、通常のポリヌクレオチド合成に用いる酸化剤である水／ヨウ素／ピリジン溶液の代わりに、15%のN, N, N', N'-テトラエチルチオラムジスルフィド／アセトニトリル溶液を用いて合成することができる。

#### 【0020】

2'-0-メチルリボヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドは、例えば、5'-ジ

メトキシトリエチル-2'-0-メチルリボヌクレオシド-3' - [ (2-シアノエチル) - (N, N-ジイソプロピル) ] - ホスホロアミダイトユニットを用いて、ホスホロアミダイト法によるDNA/RNA自動合成機を利用して合成することができる。

#### 【0021】

##### [2] 本発明の抗HIV剤

本発明のオリゴヌクレオチドは、抗HIV作用を有し、本発明の抗HIV剤の有効成分として有用である。本明細書における「抗HIV作用」とは、特に限定されるものではないが、例えば、HIV（特にHIV-1）の產生阻害作用、又はHIV（特にHIV-1）のmRNA若しくはタンパク質の発現抑制作用などを挙げることができる。

#### 【0022】

本発明の抗HIV剤は、有効成分である本発明のオリゴヌクレオチドを単独で、あるいは、所望により薬剤学的又は獣医学的に許容することのできる公知の担体又は希釈剤と共に、含有することができ、アンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分とする公知の医薬組成物の製剤技術（例えば、特開平11-292795号公報）を利用して調製することができる。

本発明の抗HIV剤としては、例えば、本発明のオリゴヌクレオチドを含む抗HIV剤、本発明のオリゴヌクレオチドに加え、血中で安定なリポソームを更に含有する抗HIV剤、あるいは、本発明のオリゴヌクレオチドを含むベクターを含有する抗HIV剤を挙げることができる。

#### 【0023】

本発明の抗HIV剤は、例えば、経口、非経口、又は局所的な経路のいずれかにより投与することができる。投与量は、治療対象動物（哺乳類、特にヒト）の種及びその薬剤に対する個体の応答性、並びに選択される製剤の剤形及び投与時間や間隔などに依存して変化するが、一般には、約500mgから約5000g／日の範囲の用量で投与することができる。

#### 【0024】

本発明の抗HIV剤は、本発明のオリゴヌクレオチド、血中で安定なリポソーム、又は本発明のオリゴヌクレオチドを含むベクター以外に、場合により医薬的に許容することのできる公知の担体又は希釈剤との組合せで、経口、非経口、又は

局所的な経路のいずれかにより、単回又は複数回で投与することができる。本発明の抗HIV剤は、種々の異なる剤形、例えば、錠剤、カプセル剤、ロゼンジ剤、トローチ剤、ハードキャンディー、粉末剤、スプレー剤、クリーム剤、軟膏剤、坐剤、ゼリー剤、ゲル剤、ペースト剤、ローション剤、軟膏剤、水性懸濁剤、注射用溶液剤、エリキシル剤、又はシロップ剤などにすることができる。

### 【0025】

#### 【実施例】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

#### 【実施例1】

##### 《アンチセンスオリゴヌクレオチドの調製》

本実施例では、図1に示すように、HIV-1のDLS (Dimer Linkage Structure) 領域に存在するDIS (Dimerization Initiation Site) の塩基配列から、3種類のアンチセンスオリゴヌクレオチドと2種類のランダムオリゴヌクレオチドを合成した。これらのオリゴヌクレオチドは、インターヌクレオチド結合が全てホスホロチオエート型結合のDNA、すなわち、ホスホロチオエート型オリゴデオキシヌクレオチド (S-ODN) である。

なお、図1において、配列番号1で表される塩基配列における各数値（例えば、「690」又は「700」）は、HIV-1 NL432株の5'LTR中のU3領域を起点として数えた塩基番号である。また、記号「*Stem*」、「*Loop*」、及び「*Bulge*」は、それぞれ、ステム領域、ループ領域、及びバルジ領域を意味する。

### 【0026】

本発明のオリゴヌクレオチドとして、「Anti-703」（配列番号4で表される塩基配列）を合成した。比較用オリゴヌクレオチドとして、「Anti-692」（配列番号2で表される塩基配列）及び「Anti-715」（配列番号6で表される塩基配列）を合成した。HIV-1のRNAと相補的な配列を有しないコントロールオリゴヌクレオチドとして、「Random」（配列番号7で表される塩基配列）及び「703-Scramble」（配列番号8で表される塩基配列）を合成した。「703-Scramble」は、本発明のオリゴヌクレオチドである「Anti-703」と同じGC含量を示す。

## 【0027】

## 【実施例2】

## 《プラスミドpNL4-3を用いたS-ODNの抗HIV作用の評価》

## (1) S-ODN及びプラスミドpNL4-3の遺伝子導入

本実施例では、ヒト腎臓細胞由来の293T細胞（ATCC番号：CRL-11268）に、HIV-1発現ベクターであるプラスミドpNL4-3（Adach, a. ら, J. Virol., 59, 248, 1986）を遺伝子導入した系を用いて、実施例1で調製したS-ODNのHIV-1産生阻害効果を評価した。

プラスミドpNL4-3は、293T細胞に遺伝子導入されると、自身のLTRプロモーターにより遺伝子発現がおこり、HIV-1が産生される。本実施例では、細胞内及び培養上清に産生されるHIV-1タンパク質p24抗原の量を測定した。

## 【0028】

S-ODN及びプラスミドpNL4-3の293T細胞への遺伝子導入は、市販のトランسفエクション試薬（FuGENETM6 Transfection Reagent; Boehringer Mannheim, L.L.C, USA）を使用し、その添付のプロトコールに準じて実施した。

具体的には、293T細胞を6ウェルプレートに、ウェル当たり105細胞／2mL培地の細胞密度となるように播き、培養器（37℃及び5% CO<sub>2</sub>）内で一晩培養した。培地としては、10%ウシ胎仔血清（FBS）を添加したダルベッコ変法イーグル培地（D-MEM）を使用した。次の日に、細胞がウェルに接着していることを確認して以下の実験に用いた。

## 【0029】

293T細胞から培地を除き、血清フリー（血清不含）のRPMI-1640培地900μLを添加して培養器（37℃及び5% CO<sub>2</sub>）に移した。予め各S-ODN及び前記トランسفエクション試薬（FuGENETM6）を、血清フリーのRPMI-1640培地で所定濃度 [S-ODN=1μmol/L, 5μmol/L, 又は10μmol/L (3段階); FuGENETM6=50倍希釈] に希釈することにより調製したFuGENETM6/S-ODN溶液100μLを各ウェルに更に添加し、プレートを軽く揺らして混和した後、培養器（37℃及び5% CO<sub>2</sub>）に移し、2時間放置した。

FuGENETM6/S-ODN溶液添加から2時間経過した後、予めプラスミドpNL4-3及び

トランسفエクション試薬 (FuGENE<sup>TM</sup>6) を、血清フリーのRPMI-1640培地で所定濃度 [プラスミドpNL4-3=0.01 μg/μL; FuGENE<sup>TM</sup>6=50倍希釈] に希釈することにより調製したFuGENE<sup>TM</sup>6/pNL4-3溶液110 μLを各ウェルに更に添加し、プレートを軽く揺らして混和した後、培養器 (37°C及び5% CO<sub>2</sub>) に移し、2時間放置した。

FuGENE<sup>TM</sup>6/pNL4-3溶液添加から2時間経過した後、培地を除き、各ウェルをリン酸緩衝化生理食塩水 [PBS(-)] 1mLで3回洗浄した。各ウェルへ10%FBS含有RPMI-1640培地3mLを加えた後、培養器 (37°C及び5% CO<sub>2</sub>) に移し、48時間培養した。

### 【0030】

#### (2) HIV-1及び細胞内タンパク質の精製

遺伝子導入から48時間後、上清500 μLを0.45 μmフィルターに通した後、1.5mLチューブに移し、HIV-1を精製した。

一方、細胞は、上清を取り除いた後、各ウェルをPBS(-)1mLで2回洗浄した。0.05%トリプシン-EDTA溶液0.5mLを加え、細胞をウェルから剥がした後、PBS(-)0.5mLを各ウェルに加え、混和した。懸濁細胞を1.5mLチューブに移し、2000rpm及び室温にて5分間遠心分離した後、上清のPBS(-)を取り除いた。沈殿した細胞に細胞溶解液 (ピッカジーン細胞溶解液; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 300 μLを加え、細胞を溶解した。37°Cで15分間放置した後、13000rpm及び室温にて、10分間遠心分離した。上清を別の1.5mLチューブに移し、これを細胞内タンパク質精製溶液とした。

### 【0031】

#### (3) p24抗原量の測定

回収した上清及び細胞内タンパク質に含有されるHIV-1のp24抗原量を、CLEIA (Chemiluminescent Enzyme Immunoassay) により測定した。

具体的には、市販の希釈液 (LUMIPULSE検体希釈液; Fujirebio Inc., Tokyo, Japan) で適当な濃度 (10~10000倍) に希釈した。溶液希釈液250 μLに、市販のp24検体処理液 (LUMIPULSE I HIV-1 p24検体処理液; Fujirebio Inc., Tokyo, Japan) 50 μLを加え、軽く混和させた。市販の測定試薬 (LUMIPULSE f; Fujirebi

o Inc., Tokyo, Japan) を用いて、この溶液中のHIV-1 p24抗原量を測定した。

### 【0032】

上清中のHIV-1 p24抗原量に関する結果を図2に、細胞内タンパク質中のHIV-1 p24抗原量に関する結果を図3に、それぞれ示す。

図2及び図3において、「NL4-3」は、コントロール（すなわち、S-ODNを添加しなかった場合）の結果である。

図2に示すように、S-ODN「Anti-703」によってHIV-1の産生が優位に抑制され、99%以上の非常に高いHIV-1産生阻害効果が示された。一般的に、アンチセンス核酸は、17mer以上の塩基数を必要とし、理論的にはこれ以上の長さにおける相同意的配列は、標的遺伝子以外に存在しないと言われている。しかし、実際には、アンチセンス核酸が標的遺伝子以外にも数塩基の相同性があれば結合し、標的以外の遺伝子発現を抑制することで細胞への高い毒性やその特異性が問題視されている。今回検討したS-ODNであるAnti-703によるウイルス産生量は、Anti-703濃度が $0.1\mu\text{mol/L}$ 、 $0.5\mu\text{mol/L}$ 、及び $1.0\mu\text{mol/L}$ と遺伝子導入量依存的に減少していることから、標的配列へのAnti-703の特異的な結合によるHIV-1産生阻害が示唆された。

また、この細胞上清中のp24量の減少が、図3に示す細胞内p24量の減少と相關していることから、Anti-703によるHIV-1産生阻害効果が、HIV-1のDIS配列を特異的に認識してHIV-1の産生及びタンパク質の翻訳を阻害していることが示された。

### 【0033】

#### 【実施例3】

##### 《プラスミドpNL-1ucを用いたS-ODNの抗HIV作用の評価》

###### (1) S-ODN及びプラスミドpNL4-3の遺伝子導入

実施例2において、Anti-703によるHIV-1産生阻害が示され、それらが高いアンチセンス効果によるHIV-1タンパク質であるp24量の産生を優位に抑制しているものであることが示された。HIV-1 p24タンパク質は、図8に示すように、Gag前駆体タンパク質から作られる構造タンパク質であり、そのmRNAはHIV-1ゲノムRNAと同一のRNAから翻訳される。今回標的としたHIV-1のDIS領域が、SDの上流に位

置している（図7参照）ため、すべてのHIV-1のmRNAに存在することから、本実施例では、選定したS-ODNが他のmRNAにも効果的に作用するのかをプラスミドpNL-lucを利用して検討した。

#### 【0034】

プラスミドpNL-lucは、HIV-1遺伝子のnef領域とenv領域を欠損させ、その領域にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミドである（図8参照）。核内で転写されたHIV-1ゲノムRNAは、細胞核内のスプライス機構を受け、それぞれ固有のタンパク質を発現するmRNAになる。実施例2で評価したp24抗原は、HIV-1ゲノムRNAから翻訳される遺伝子産物であるのに対して、ルシフェラーゼタンパク質は、核内で一度スプライシングされたmRNAから翻訳される。このプラスミドpNL-lucを利用することで、HIV-1のDISを標的とする優位性について評価した。

#### 【0035】

具体的には、293T細胞を6ウェルプレートに、ウェル当たり $5 \times 10^5$ 細胞／2mL培地の細胞密度となるように播き、培養器（37°C及び5% CO<sub>2</sub>）内で培養した。細胞を播いてから14時間後に、細胞がウェルに接着していることを確認して以下の実験に用いた。この時点での細胞は、約30%程度の細胞密度であった。

293T細胞から培地を除き、血清フリーのD-MEM 900 μLを添加して培養器（37°C及び5% CO<sub>2</sub>）に移した。15分後、予め各S-ODN及びトランスフェクション試薬（FuGENE<sup>TM</sup>6）を、血清フリーのD-MEMで所定濃度 [S-ODN=10 μmol/L； FuGENE<sup>TM</sup>6=50倍希釈] に希釈することにより調製したFuGENE<sup>TM</sup>6/S-ODN溶液100 μLを各ウェルに更に添加し、プレートを軽く揺らして混和した後、培養器（37°C及び5% CO<sub>2</sub>）に移し、2時間放置した。

FuGENE<sup>TM</sup>6/S-ODN溶液添加から2時間経過した後、予めプラスミドpNL-luc及びトランスフェクション試薬（FuGENE<sup>TM</sup>6）を、血清フリーのD-MEMで所定濃度 [プラスミドpNL-luc=0.01 μg/μL； FuGENE<sup>TM</sup>6=50倍希釈] に希釈することにより調製したFuGENE<sup>TM</sup>6/pNL-luc溶液100 μLを各ウェルに更に添加し、プレートを軽く揺らして混和した後、培養器（37°C及び5% CO<sub>2</sub>）に移し、2時間放置した。

FuGENE<sup>TM</sup>6/pNL-luc溶液添加から2時間経過した後、培地を除き、各ウェルへ10% FBS含有D-MEM 2mLを加えた後、培養器（37°C及び5% CO<sub>2</sub>）に移し、48時間培

養した。

### 【0036】

#### (2) 細胞内タンパク質の精製

遺伝子導入から48時間後、上清を取り除き、各ウェルをPBS(-)1mLで2回洗浄した。0.05%トリプシン-EDTA溶液0.5mLを加え、培養器(37°C及び5%CO<sub>2</sub>)内で5分間放置することにより、細胞をウェルから剥がした後、PBS(-)500μLを各ウェルに加え、混和した。懸濁細胞を1.5mLチューブに移した。この細胞懸濁液の内、50μLは、細胞数を数えるために使用した。細胞懸濁液を2000rpm及び室温にて3分間遠心分離した後、上清のPBS(-)を取り除いた。PBS(-)300μLに細胞を懸濁した後、150μLを別の1.5mLチューブに移し、後述の実施例3(4)で使用した。残る細胞懸濁液150μLを2000rpm及び室温にて5分間遠心分離した後、上清のPBS(-)を取り除いた。沈殿した細胞にピッカジーン細胞溶解液(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)100μLを加え、細胞を溶解した。13000rpm及び室温にて、10分間遠心分離した。上清を別の1.5mLチューブに移し、これを細胞内タンパク質精製溶液とした。

### 【0037】

#### (3) 細胞内タンパク質中のルシフェラーゼ活性の測定

細胞内タンパク質精製溶液中のルシフェラーゼ活性は、細胞内タンパク質精製溶液10μLに発光基質液(東洋インキ株式会社)100μLを添加し、ルミノメーター(LUMAT LB 9507; BERTHOLD)により測定した。

結果を図4に示す。図4において、「Ran」は、S-ODN「Random」の結果であり、「703-Scr」は、S-ODN「703-Scramble」の結果であり、「NL-luc」は、コントロール(すなわち、S-ODNを添加しなかった場合)の結果である。

### 【0038】

図4に示すように、細胞内HIV-1遺伝子発現量をルシフェラーゼ活性にて評価した結果、HIV-1のDISを標的としたS-ODNにおいてその阻害効果がみられた。特にAnti-703においては、HIV-1タンパク質p24抗原の発現を抑制したのと同様に、ルシフェラーゼ活性試験においても顕著にタンパク質の発現を阻害していた。従来、アンチセンス核酸の機能として、標的RNAとアンチセンス核酸との結合が、

翻訳過程においてリボソームの進行を阻害することでタンパク質合成を抑制することが知られている。今回検討したS-ODNのAnti-703による効果的なHIV-1産生阻害効果は、HIV-1のDISに効果的に作用してアンチセンス核酸の機能を充分に発揮したものであると考えられる。しかし、HIV-1 RNAのDISを標的とした他のS-ODNによる効果的なHIV-1阻害効果がみられなかつたことから、標的RNAへのアンチセンス核酸の部位選定が重要であることが示唆された。

なお、アンチセンス核酸は、その配列内にあるGC含量により非特異的なRNAとの相互作用による細胞毒性が知られている。本実施例ではHIV-1産生阻害効果のあったAnti-703とGC含量を同様にした703-Scramble (703-Scr) についても同様に試験をおこなったが、このアンチセンスによる遺伝子発現の阻害機構は見られなかつた。

#### 【0039】

これらの結果から、Anti-703によるHIV-1の産生量の減少が、HIV-1タンパク質合成量の減少に寄与していること、また、HIV-1 RNAのDIS配列を特異的に認識することで、HIV-1ゲノムRNAのみならずmRNAにも効果的に作用してHIV-1の産生及び遺伝子発現を効率よく阻害していることが示され、このHIV-1のDIS領域がHIV-1抑制において効果的な標的部位となりうることが示唆された。

#### 【0040】

##### (4) 細胞内HIV-1 RNAの発現量の解析

これまで述べたように、Anti-703が効果的にHIV-1タンパク質の発現を効果的に抑制していることが示されたが、アンチセンス核酸の機能としてS-ODNや天然型アンチセンス核酸による標的RNAとの二重鎖形成が、細胞内RNase Hの基質となり、標的RNAが分解されることが知られている。そこで、本実施例で選定したS-ODNによる標的RNAへのRNase H活性の検討を行なうために、細胞内HIV-1のRNA量を解析した。

#### 【0041】

具体的には、実施例3(2)で得られた細胞懸濁液から、市販のRNA抽出試薬〔TRIZOL (登録商標) Reagent; Invitrogen Japan K.K.]を用いて細胞内RNAを抽出し、更にDNase I処理した総RNAを用いて逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応

(RT-PCR) を実施した。RT-PCR用のプライマーとしては、HIV-1 RNAのgag領域を特異的に増幅するプライマーを用いた。また、内部コントロール用のプライマーとして、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (G3PDH) を増幅するプライマーを用いた。

#### 【0042】

結果を図5に示す。図5において、「M」は、DNAマーカーを意味し、「NL-luc」は、プラスミドpNL-lucを添加し、S-ODNを添加しなかった場合の結果であり、「N.C.」は、プラスミドpNL-luc及びS-ODNを添加しなかった場合の結果であり、「RT(-)pNL-luc」は、プラスミドpNL-lucを添加し、逆転写酵素を添加しなかった場合の結果である。

図5に示すように、S-ODN「Random」若しくはS-ODN「703-Scramble」、又はプラスミドpNL-lucを単独に遺伝子導入した細胞においてはバンドの蛍光変化が見られないのに対して、HIV-1のDISを標的としたS-ODNにおいてはHIV-1 RNA遺伝子発現量の減少がみられ、特にAnti-703においては、RT-PCRによるRNA遺伝子増幅がまったくみられなかった。

以上の結果より、今回検討したAnti-703による効果的なHIV-1産生阻害効果が、細胞内タンパク質の合成阻害と標的RNAへの結合によるRNAの分解によるものであり、Anti-703によるアンチセンス核酸としての機能によるものであると考えられる。

#### 【0043】

以上の結果から、今回選定したS-ODNによるHIV-1産生阻害効果がHIV-1タンパク質の発現及びRNA量の減少によるものであり、S-ODN (Anti-703) が、HIV-1のDISに対して配列特異的に標的RNAへ結合してウイルス粒子の産生を阻害したことが明らかになった。また、HIV-1タンパク質の発現解析より、今回標的としたHIV-1のDIS領域が、ゲノムRNAのみならずmRNAにおいても重要な配列であり、アンチセンス法における効果的な標的部位であることが証明された。

#### 【0044】

#### 【実施例4】

#### 《ヒト末梢血リンパ球を用いた抗HIV-1活性の検証（1）》

実施例2及び3で評価したAnti-703と、S-ODNの標的を前記Anti-703から5'側又は3'側に10残基ずらした配列であるAnti-694（配列番号3で表される塩基配列）又はAnti-713（配列番号5で表される塩基配列）の抗HIV-1活性をヒト末梢血リンパ球を用いて評価した。

健常人の末梢血よりリンパ球を分離し、HIV-1 NL432株（Adachi, A. et al., J. Virol., 59, 284, 1986）を氷上で90分間吸着させた後、RPMI-1640培地で3回洗浄し、細胞に吸着しなかった余分なウイルスを除去した。そこに、Anti-703を含む各種S-ODN（ $0.5 \mu\text{mol/L}$ ）を遺伝子導入剤DMRIE-C（Invitrogen）と混合し、細胞に添加して培養を開始した。4日ごとに培地を交換し、14日目に細胞培養上清中に產生されたウイルスタンパク質HIV-1 p24抗原量を測定した。

#### 【0045】

結果を図9に示す。なお、図9において、「PC」はS-ODNを添加しなかった陽性対照の結果である。

図9に示したように、Anti-703のスクランブル配列のS-ODN(Scramble)以外の3つのS-ODN(Anti-703, Anti-694, 及びAnti-713)において、陽性対照と比較して非常に高い抗ウイルス活性が認められた。この結果は、これらのS-ODNがヒト末梢血リンパ球へのウイルス感染を阻害することを示している。

#### 【0046】

#### 【実施例5】

##### 《ヒト末梢血リンパ球を用いた抗HIV-1活性の検証（2）》

S-ODNとして、Anti-694及びAnti-713の代わりに、gag領域を標的とする28AS（配列番号9で表される塩基配列）、及びウイルス遺伝子の逆転写に重要なポリプリントラック領域を標的とするPPT-AS（配列番号10で表される塩基配列）を用いること以外は、前記実施例4に記載の手順を繰り返した。

結果を図10に示す。なお、図10において、「703AS」はAnti-703の結果であり、「PC」はS-ODNを添加しなかった陽性対照の結果である。

gag領域を標的とする28AS、あるいは、ウイルス遺伝子の逆転写に重要なポリプリントラック領域を標的とするPPT-ASは、DIS領域を標的とするAnti-703ほどウイルスタンパク質の発現を抑制することができなかった。

**【0047】****【発明の効果】**

本発明のオリゴヌクレオチドは、抗HIV剤の有効成分として有用であり、本発明の抗HIV剤によれば、より効果的なHIVの感染治療及び／又は感染予防が可能である。

**【0048】****【配列表フリーテキスト】**

配列番号2～10の配列で表される各塩基配列は、全てのインターヌクレオチド結合がホスホロチオエート型結合である。

更に、配列番号7及び8で表される各塩基配列は、人工的に合成したランダム配列である。

**【0049】****【配列表】**

<110> JUNSEI CHEMICAL CO., LTD.

<120> Novel antisense oligonucleotide and anti-HIV agent

<130> TAK02001P

<160> 10

<210> 1

<211> 49

<212> RNA

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 1

acgcaggacu cggcuugcug aagcgcgcac ggcaagaggc gaggggcgg

49

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> All internucleotide bonds are phosphorothioate bonds.

<400> 2

c<sub>t</sub>t<sub>c</sub>a<sub>g</sub>c<sub>a</sub>a<sub>g</sub> c<sub>c</sub>g<sub>a</sub>g<sub>t</sub>c<sub>c</sub>t<sub>g</sub>

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> All internucleotide bonds are phosphorothioate bonds.

<400> 3

c<sub>g</sub>c<sub>t</sub>t<sub>c</sub>a<sub>g</sub>c<sub>a</sub> a<sub>g</sub>c<sub>c</sub>g<sub>a</sub>t<sub>c</sub>c

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> All internucleotide bonds are phosphorothioate bonds.

<400> 4

tgcgtgcgc gcttcagcaa

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> All internucleotide bonds are phosphorothioate bonds.

<400> 5

cctcgccctc tgccgtgcgc

20

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(19)

<223> All internucleotide bonds are phosphorothioate bonds.

<400> 6

ccctcgccctc ttgccgtgc

19

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized random sequence

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> All internucleotide bonds are phosphorothioate bonds.

<400> 7

gcgtcatacg tcttgccgac

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized random sequence

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> All internucleotide bonds are phosphorothioate bonds.

<400> 8

cggttacgcc atgcgcatcg

20

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> All internucleotide bonds are phosphorothioate bonds.

<400> 9

cgctctcgca cccatctctc tccttcta

28

<210> 10

<211> 37

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> All internucleotide bonds are phosphorothioate bonds.

<400> 10

ttttcttttg gggggttttt ttccccccctt ttctttt

37

### 【図面の簡単な説明】

#### 【図1】

実施例で使用した各種S-ODNの配列と、その標的配列であるHIV-1のDIS領域との関係を示す説明図である。

**【図2】**

種々濃度の各種S-ODN ( $0.1\mu\text{mol/L}$ 、 $0.5\mu\text{mol/L}$ 、及び $1.0\mu\text{mol/L}$ ) 及びプラスミドpNL4-3 ( $1\mu\text{g}$ ) をトランスフェクトした293T細胞における、培養上清中のHIV-1 p24抗原量を測定した結果を示すグラフである。

**【図3】**

種々濃度の各種S-ODN ( $0.1\mu\text{mol/L}$ 、 $0.5\mu\text{mol/L}$ 、及び $1.0\mu\text{mol/L}$ ) 及びプラスミドpNL4-3 ( $1\mu\text{g}$ ) をトランスフェクトした293T細胞における、細胞内タンパク質中のHIV-1 p24抗原量を測定した結果を示すグラフである。

**【図4】**

各種S-ODN ( $1\mu\text{mol/L}$ ) 及びプラスミドpNL-1uc ( $1\mu\text{g}$ ) をトランスフェクトした293T細胞における、細胞内タンパク質中のルシフェラーゼ活性を測定した結果を示すグラフである。

**【図5】**

各種S-ODN ( $1\mu\text{mol/L}$ ) 及びプラスミドpNL-1uc ( $1\mu\text{g}$ ) をトランスフェクトした293T細胞における、細胞内HIV-1mRNA遺伝子発現レベルをRT-PCRにより検出した結果を示す、図面に代わる写真である。

**【図6】**

HIV-1ゲノムRNA及びその5'端の構造を模式的に示す説明図である。

**【図7】**

HIV-1ゲノムRNAの5'端の構造（A）及びその2次RNA構造モデル（B）を模式的に示す説明図である。

**【図8】**

HIV-1ゲノムRNA（A）及びウイルスmRNA（B）の翻訳機構を模式的に示す説明図である。

**【図9】**

ヒト末梢血リンパ球を標的とした抗ウイルス活性の測定結果を示すグラフである。

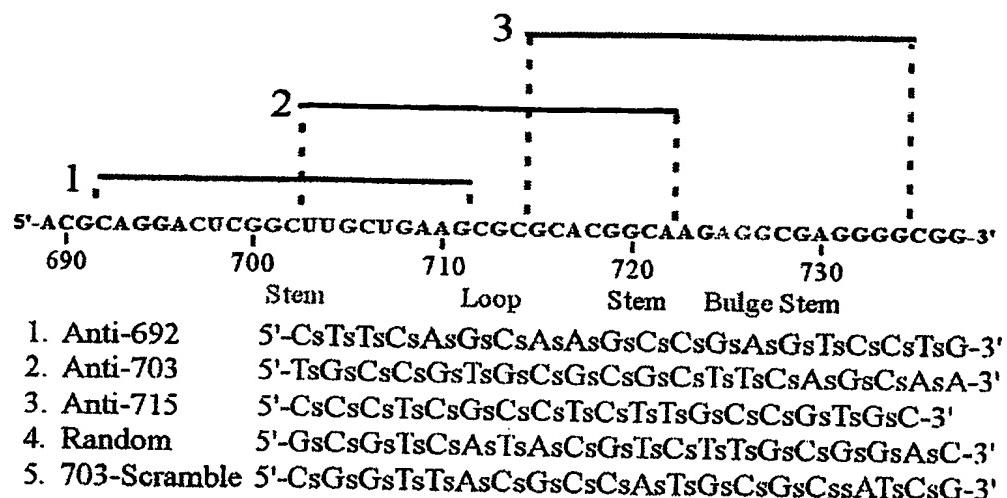
**【図10】**

ヒト末梢血リンパ球を標的とした抗ウイルス活性の測定結果を示すグラフである。

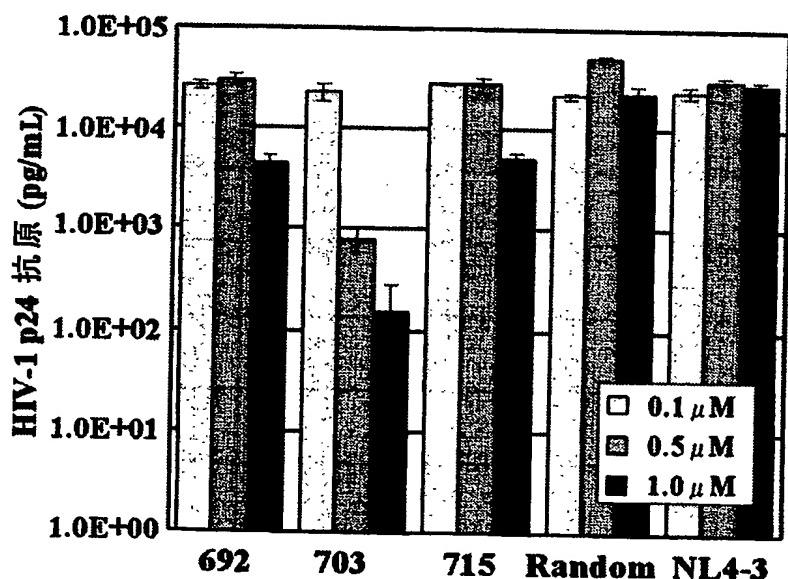
る。

【書類名】 図面

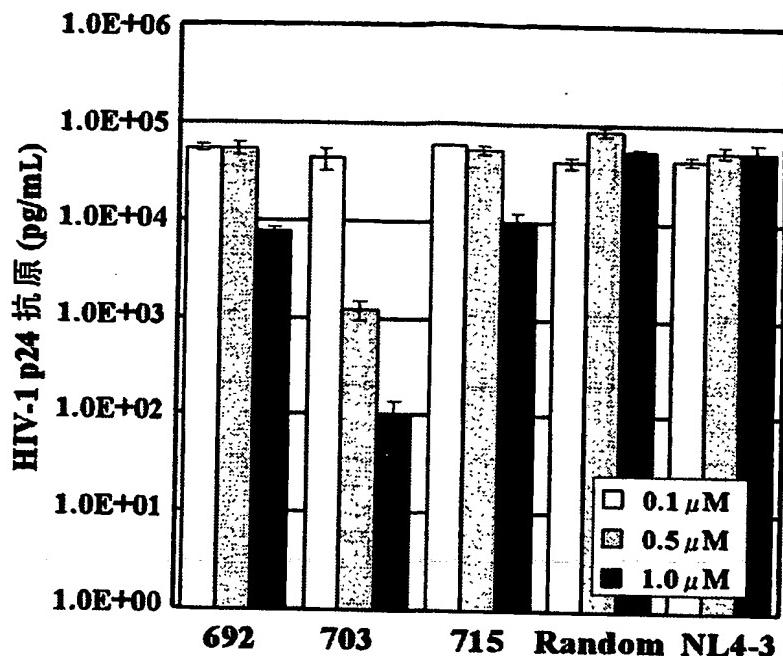
【図 1】



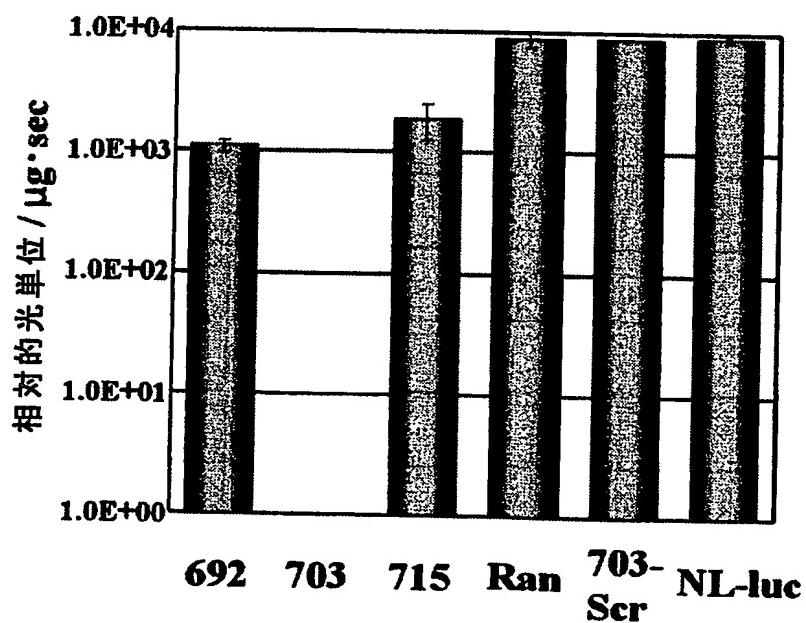
【図 2】



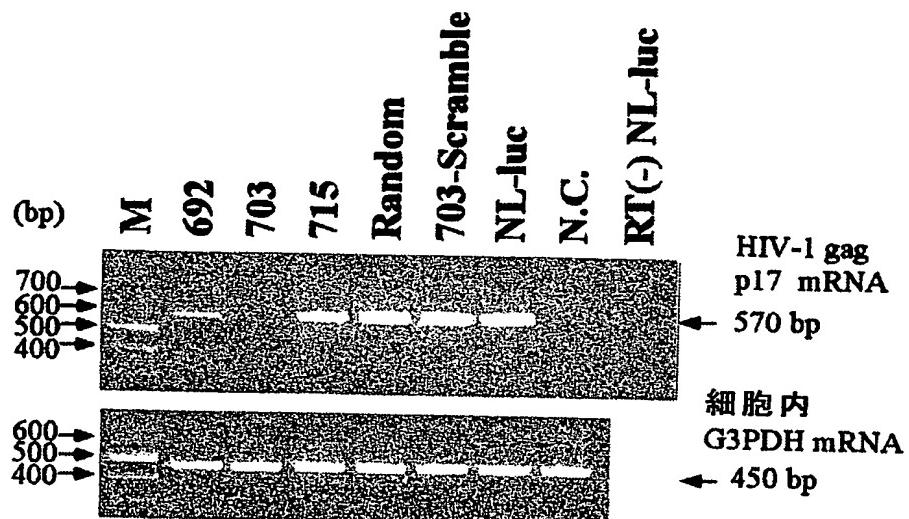
【図3】



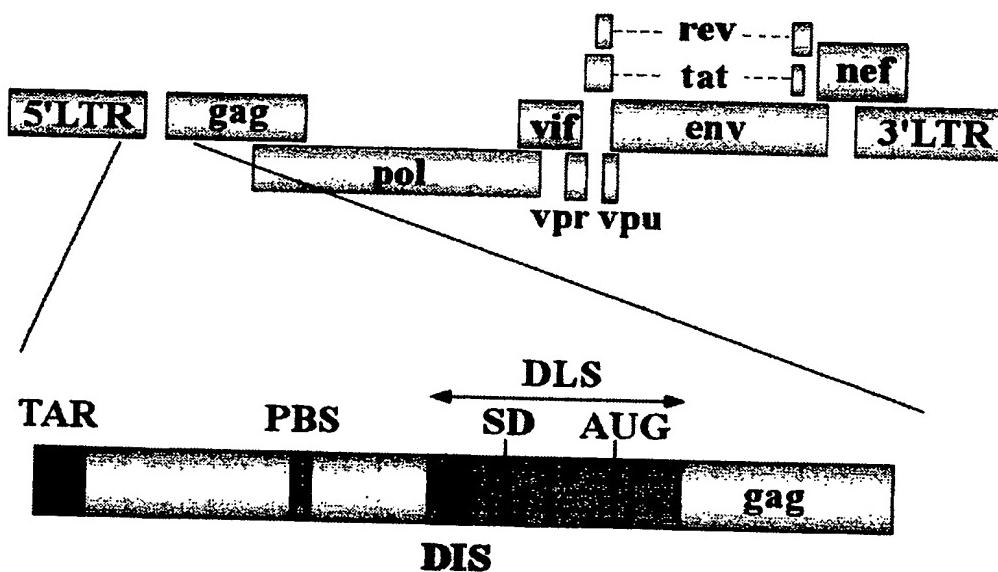
【図4】



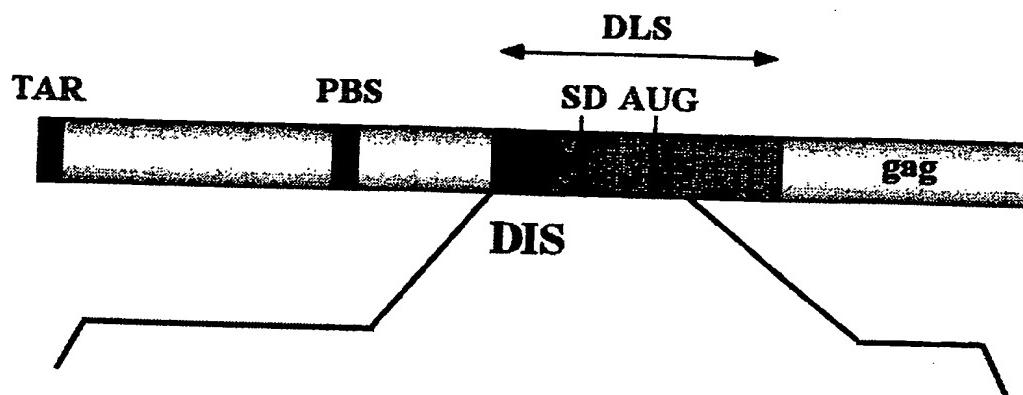
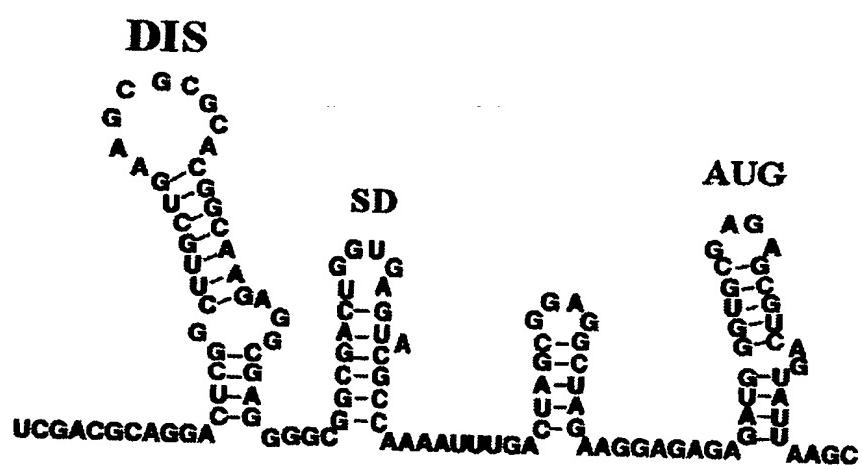
【図 5】



【図 6】

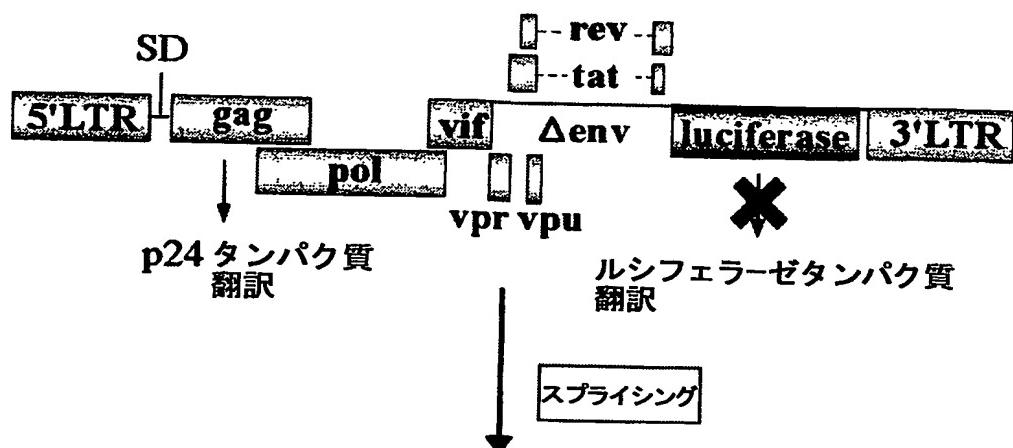


【図7】

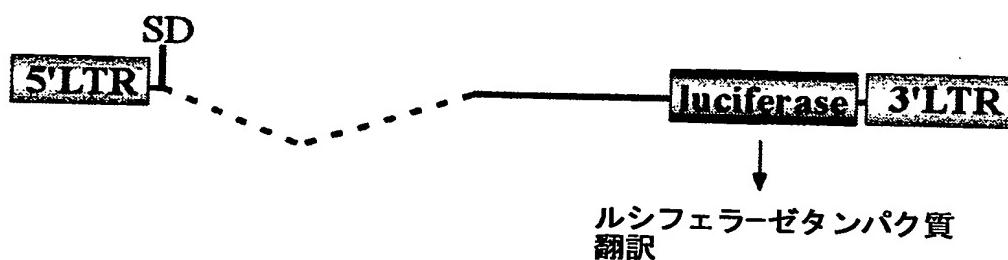
**A****B**

【図 8】

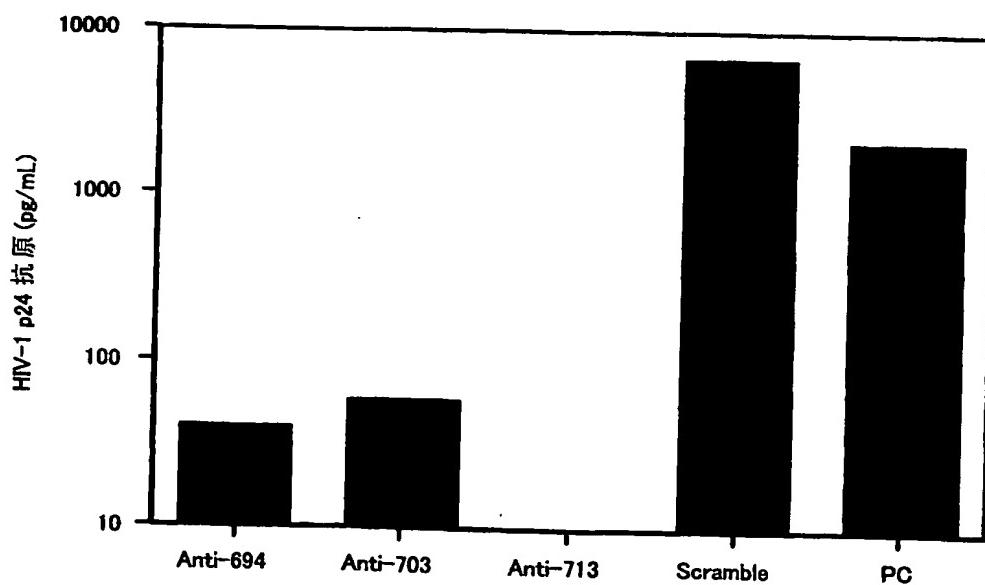
## (A) ゲノム RNA



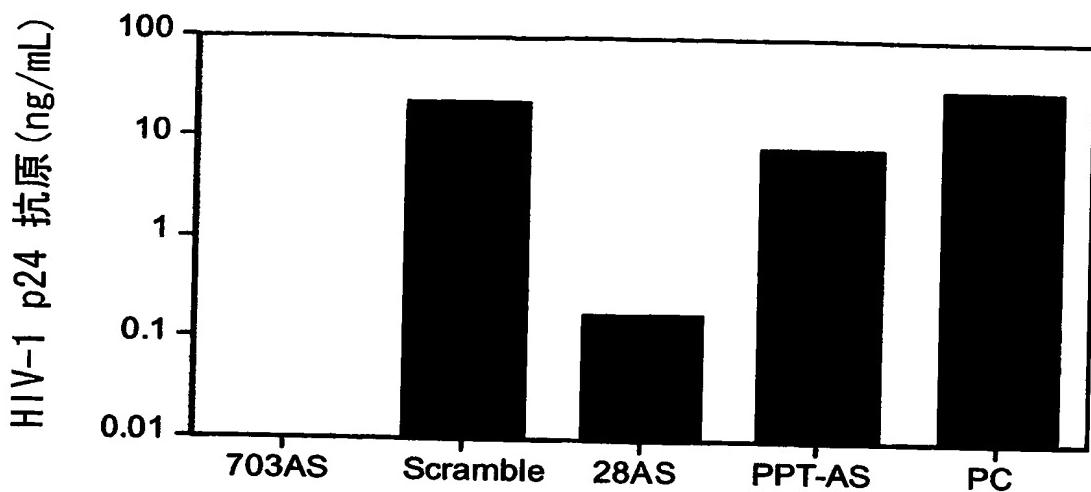
## (B) ルシフェラーゼタンパク質 mRNA



【図 9】



【図10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 より効果的なHIVの感染治療及び／又は感染予防を可能とする、抗HIV剤の有効成分として有用な新規アンチセンスオリゴヌクレオチド、及びそれを含有する抗HIV剤（HIV治療及び／又は予防剤）を提供する。

【解決手段】 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、HIV-1のDIS（Dimerization Initiation Site）領域を標的とする。

【選択図】 なし

## 認定・付与口印青幸良

特許出願の番号	特願2003-076254
受付番号	50300452392
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 3月20日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【提出日】	平成15年 3月19日
-------	-------------

次頁無

出証特2004-3034309

特願 2003-076254

出願人履歴情報

識別番号

[591028577]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

1999年12月17日

名称変更

東京都中央区日本橋本町4丁目4番16号

純正化学株式会社

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**  
**As rescanning documents *will not* correct images problems checked, please do not report the problems to the IFW Image Problem Mailbox**